

## CAPÍTOL V

### DETERMINACIÓ CINÈTICA DE MESCLES QUATERNÀRIES DE SULFONAMIDES PER REACCIÓ AMB 3-METIL-2-BENZOTIAZOLONA HIDRAZONA

---

#### V.1. OBJECTIU

En aquest capítol es desenvolupa un mètode cinètico-espectrofotomètric per a l'anàlisi simultani de quatre sulfonamides: el sulfatiazol (SFT), la sulfadiazina (SDZ), la sulfamerazina (SMRZ) i la sulfametazina (SMTZ), les quals sovint s'utilitzen conjuntament en preparacions comercials. El mètode utilitza la reacció de azo-copulació oxidativa que té lloc entre aquestes sulfonamides i la 3-metil-2-benzotiazolona hidrazona (MBTH) en presència de Fe(III) com agent oxidant.

El treball presentat en aquest capítol es troba dividit en dues parts ben diferenciades:

La primera part té com a objectiu establir les condicions experimentals més idònies, les quals permetin una adequada discriminació espectral i cinètica entre els productes formats. Amb aquesta finalitat es realitza un disseny experimental, on s'estudia el comportament de cada sulfonamida per separat sota les variables considerades més influents.

La segona part continua amb el registre cinètic i el tractament de les dades per mitjà de la aplicació de tècniques de calibració multivariables, tals com la regressió Parcial per Mínims Quadrats (PLS), la regressió Parcial per Mínims Quadrats Multi Via (nPLS) i les Xarxes Neuronals Artificials (ANNs).

## V.2. INTRODUCCIÓ

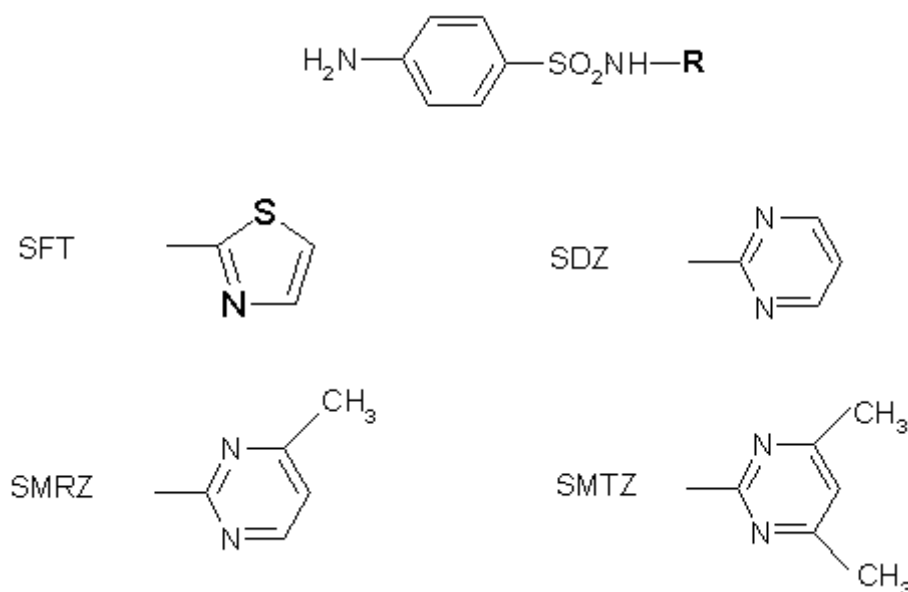
Les sulfonamides constitueixen una família important de compostos antibactericides, àmpliament estesa en la pràctica humana, particularment en pacients al·lèrgics als antibiòtics, i especialment utilitzada en el camp de la indústria veterinària pel tractament d'infeccions urinàries.

Però curiosament i malgrat ser espècies estructuralment i farmacològicament molt similars, degut tant a la seva baixa solubilitat com a la dels seus derivats acetilats, freqüentment s'administren conjuntament en preparacions que són mescles binàries o ternàries de diferent contingut i composició. La combinació de varies sulfonamides redueix la incidència d'aquest problema, ja que cada compost ingerit com una part de la dosi total, actua independentment des del punt de vista de solubilitat. Com a conseqüència, forces combinacions de sulfonamides es troben disponibles com a productes comercials, i per tant és important desenvolupar mètodes amb els quals es pugui determinar el seu contingut.

A la bibliografia s'exposen nombrosos mètodes analítics per la seva determinació en un ampli ventall de mostres. Generalment es tracten de mètodes cromatogràfics, ja sigui en capa fina (TLC), gasos (GC), amb o sense derivatització prèvia, o cromatografia líquida d'elevada resolució (HPLC) [Turczan, 1968; Nose, 1976; Poet, 1973; Jen, 1998; Stoev, 2000]. Actualment, els mètodes que es troben referenciats a la bibliografia amb major freqüència per la determinació de mescles de sulfonamides en presència de matrius complexes, són els basats amb HPLC combinada moltes vegades amb espectrometria de masses (MS) [Porter, 1994], i en tècniques relacionades com ara la cromatografia de fluids supercrítics (SFC) [Perkins, 1991] i electroforesi capilar (CE) [Ng, 1993; Niessen, 1998].

Alguns mètodes espectroscòpics també han estat descrits, i així trobem mètodes basats en la mesura dels espectres UV de les sulfonamides, dels espectres UV-Visible o fluorescent dels seus derivats químics [El-Kommos, 1988; Sterling, 1974, Mahadero, 1992a], i inclús dels espectres induïts fotoquímicament [Mahadero 1992b]. Ara bé, a causa de la similitud espectral existent en cada una de les propostes, durant molt de temps aquests mètodes s'han restringit a la determinació individual i del contingut total de sulfonamides en diverses mostres [Bratton i Marshall, 1939; Salinas, 1990]. S'han dut a terme algunes temptatives enfocades al tractament de les dades espectroscòpiques, a fi de fer possible l'anàlisi de mescles. D'una banda, s'han assolit bons

resultats per aplicació de tècniques de derivada, sobre les dades espectroscòpiques obtingudes amb alguns dels procediments anteriorment esmentats [Sánchez-Peña, 1995]. Aquests mètodes resulten ser una bona eina per la seva gran simplicitat, no obstant això, es troben força limitats al nombre d'espècies que són capaços de resoldre. D'altra banda, l'aplicació de les tècniques de calibració multivariable, ha permès la resolució de mescles més complexes per mitjà d'alguns dels mètodes abans únicament utilitzats per l'anàlisi individual. Així s'han resolt mescles quaternàries per mitjà del registre dels espectres UV [Espinosa Mansilla, 1996] i mescles binàries a partir dels espectres fluorescents induïts fotoquímicament [Sánchez Peña, 1994]. En tots aquests treballs, la tècnica de calibració multivariable utilitzada ha estat la regressió Parcial per Mínims Quadrats (PLS). També s'ha descrit un mètode polarogràfic [Galeano Diaz, 1996] per la resolució de mescles ternàries.



Esquema 5.1

En aquest capítol es posa a punt un procediment per l'anàlisi de mescles de sulfatiazol (SFT), sulfadiazina (SDZ), sulfamerazina (SMRZ) i sulfametazina (SMTZ) (esquema 5.1), les quals tenen una estructura molt propera, basat en el registre en funció del temps de la variació dels espectres d'absorbància dels derivats químics de la azo-copulació oxidativa amb MBTH en presència de Fe(III), i la posterior aplicació dels mètodes de calibració multivariable. Els espectres dels productes derivats d'aquesta reacció mostren gran dependència amb el pH del medi de reacció, i presenten màxims d'absorbància a la regió del visible.

El procés cinètic que es segueix és força complicat i molt dependent de les condicions experimentals, i malgrat el reactiu es posi en excés, l'ordre de reacció seguit no és el de pseudoprimer ordre esperat inicialment, com a conseqüència de processos laterals que el consumeixen. Tal i com es comprova en la posta a punt del mètode, la descomposició del reactiu és el procés cinèticament predominant a totes les temperatures i és especialment molt ràpid a temperatures altes. Un altre fet no esperat és l'existència de temps d'inducció per algunes de les espècies analitzades, a mesura que augmenta l'acidesa del medi de reacció. Així, el sistema que s'aborda es troba subjecte a fortes no-linealitats. A la complexitat del mecanisme s'afegeix el fet que per parelles de sulfonamides, tant el comportament cinètic com els espectres dels productes són molt semblants. D'una banda tenim que existeixen poques diferències en el senyal registrat per la parella sulfatiazol-sulfadiazina, i el mateix passa per la parella sulfamerazina-sulfametazina. Això fa que sigui molt interessant la realització d'un estudi en profunditat de les condicions que més influeixen en el procés, per tal d'establir la situació més idònia, que permeti una major discriminació cinètica i espectral entre els azo-colorants formats. Un cop assolit aquest punt, es procedeix al registre cinètic d'un conjunt de mescles de sulfonamides preparades al laboratori, per tal de preparar la calibració del sistema. S'estudien i es comparen tant la regressió Parcial per Mínims Quadrats (PLS), la regressió Parcial per Mínims Quadrats Multi Via (nPLS), com les Xarxes Neuronals Artificials (ANNs).

Finalment s'aplica el mètode proposat a la quantificació d'aquestes sulfonamides en diferents mostres comercials d'ús veterinari, contrastant els resultats amb els obtinguts per HPLC.

### V.3. EXPERIMENTAL

#### V.3.1. REACTIUS I DISSOLUCIONS

Es preparen dissolucions estoc en 0,5 M HCl de les diferents sulfonamides pures (Sigma) per pesada directa (Sulfatiazol (SFT)  $3,75 \times 10^{-3}$  M; sulfadiazina (SDZ)  $3,75 \times 10^{-3}$  M; sulfamerazina (SMRZ)  $1,88 \times 10^{-3}$  M; i sulfametazina (SMTZ)  $4,13 \times 10^{-3}$  M). Un cop preparades es protegeixen de la llum i es guarden a 4-5 °C a la nevera. En aquestes condicions, les dissolucions poden ser utilitzades durant dos dies. A partir de les dissolucions anteriors, es construeix el conjunt de mescles per a la realització dels models de calibració. Per tal de portar a terme la selecció de les condicions experimentals, es preparen dissolucions pures  $1,25 \times 10^{-3}$  M de cada sulfonamida en HCl 0,1 M.

Es prepara diàriament una dissolució estoc 0,0250 M del reactiu 3-metil-2-benzotiazolona hidrazona (MBTH) (Aldrich) per pesada directa.

Quant a l'agent oxidant, es prepara una dissolució 0,15 M de Fe(III) en HCl 1,5 M, a partir del  $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (Merck). Per tal de portar a terme la selecció de les condicions experimentals, es preparen dissolucions 0,05 M, 0,10 M i 0,15 M de Fe(III) en HCl 0,2 M.

Es prepara HCl 5,0M per dilució de l'àcid clorhídric concentrat (Panreac).

Tots els reactius que s'utilitzen són de grau analític, i totes les dissolucions són preparades amb aigua bidestil·lada.

S'analitzen dues dissolucions comercials de sulfonamides d'ús veterinari, Coccitaber®-N (Hoechst-Roussel Veterinaria A.I.E. Barcelona, Espanya) de composició nominal 50, 30 i 120 mg/ml en SFT, SMRZ i SMTZ, respectivament, i GranadiSulfa® (Industrial Veterinaria, S.A., Barcelona, Espanya), de 100, 50 i 50 mg/ml en SFT, SDZ i SMRZ, respectivament.

#### V.3.2. PROCEDIMENT CINÈTIC D'ANÀLISI

Les diferents dissolucions, s'afegeixen directament a la cel·la espectrofotomètrica mitjançant l'ús de micropipetes. El procediment que es segueix consisteix en afegir a la cubeta en primer lloc 1 ml de dissolució de MBTH, i seguidament 1 ml de cada una de les mescles de sulfonamides. A

continuació, la cubeta es col·loca a l'espectrofotòmetre, mantenint la temperatura a  $25,0 \pm 0,1$  °C, i aleshores s'inicia l'agitació. Després d'uns minuts, es registra l'espectre de referència i llavors comença la reacció per l'addició, ja en últim lloc, de 0,5 ml de la dissolució de Fe(III). Tot seguit, s'inicia el registre de la cinètica als 15 segons de l'addició de la primera gota de reactiu, temps que s'agafa com a temps inicial de reacció. Tant la temperatura com l'agitació es manté constant durant tot el registre cinètic. La concentració final de MBTH és de  $1,00 \times 10^{-2}$  M, la concentració pel sulfatiazol, la sulfadiazina, la sulfamerazina i la sulfametazina es troba compresa entre  $(0-3,00) \times 10^{-4}$  M,  $(0-3,00) \times 10^{-4}$  M,  $(0-1,30) \times 10^{-4}$  M, i  $(0-2,86) \times 10^{-4}$  M, respectivament, la concentració de Fe(III) és de  $3,0 \times 10^{-2}$  M, i la concentració d'àcid clorhídric del medi de 0,5 M.

L'espectre del sistema reaccionant es registra a intervals de 2 nm en el rang de longituds d'ona de 500-750 nm, i a intervals de 20 segons durant 20 minuts, utilitzant un temps d'integració de 1 segon.

Per a l'establiment de les condicions experimentals, es segueix un procediment molt similar a l'anterior, però les quantitats afegides de cada espècie són lleugerament diferents, i per tant també ho són les concentracions finals. En aquest cas, s'afegeix a la cubeta en primer lloc 0,5 ml d'una dissolució de MBTH 0,05 M, després 1 ml d'una de les sulfonamides pures  $1,25 \times 10^{-3}$  M, i finalment 0,5 ml de HCl de diferent concentració. D'aquesta manera, la concentració final de MBTH en cada experiment és ara també de  $1,00 \times 10^{-2}$  M, la concentració final de cada sulfonamida de  $5,00 \times 10^{-4}$  M, i s'assoleixen valors de concentració de HCl compresos entre 0,1 i 0,5 M. Aleshores es procedeix de forma idèntica al registre de les mescles, afegint però 0,5 ml de Fe(III) a diferents concentracions.

Per a l'anàlisi dels preparats farmacèutics comercials es segueix el mateix procediment que per les mescles preparades per construir la calibració, però ara s'afegeix un volum de 1 ml de cada una de les mostres comercials sotmeses a una adequada dilució. S'analitzen 6 al·lquotes de cada mostra.

### V.3.3. PREPARACIÓ DE LES MESCLES AL LABORATORI

Es registren en dies diferents i amb un ordre totalment aleatori, un total de 127 mescles, escollides aleatòriament d'entre les 256 corresponents a un disseny factorial complet  $4^4$ . Els quatre nivells

de concentració es seleccionen de manera que el nivell més baix sigui l'absència de l'analit i de forma que les concentracions dels analits en els diferents preparats comercials, es trobin el més a prop possible del centre del disseny. Els nivells de concentració escollits són de (0, 1,00, 2,00, 3,00) $\times 10^{-4}$ M pel sulfatiazol i per la sulfadiazina, de (0, 0,50, 1,00, 1,30) $\times 10^{-4}$ M per la sulfamerazina, i de 0, 1,10, 2,20, 2,86) $\times 10^{-4}$ M per la sulfametazina.

Aquestes mostres es divideixen en dos conjunts: calibració (97) i predicció (30). Les mescles de calibració són dividides en dos conjunts quan es construeixen els models ANNs i nPLS; un de 65 mostres de calibració i un de 32 mostres de *test-set* per tal de validar els models construïts. També es registren unes altres 11 mescles de idèntica composició però preparades en dies diferents, a fi de calcular la reproduïbilitat del mètode desenvolupat.

A la taula 5.1 es mostra la composició del conjunt de mescles de calibració i de predicció, on s'indica la concentració mitjançant els diferents nivells compresos entre 0 i 3, els quals es corresponen a les concentracions dels extrems del disseny. Les mostres del conjunt de predicció es troben incloses dins del interval definit per les anteriors.

**Taula 5.1.** Composició de les mostres utilitzades en la construcció dels diferents models de calibració i predicció. Els números indiquen el nivell de concentració per cada sulfonamida.

Mostra	Calibració				Predicció			
	SFT	SDZ	SMRZ	SMTZ	SFT	SDZ	SMRZ	SMTZ
1	1	1	1	0	3	3	1	0
2	1	1	2	0	2	2	3	0
3	1	2	2	0	1	1	0	1
4	2	2	2	0	2	1	0	1
5	2	3	3	0	1	2	0	1
6	3	3	3	0	1	3	0	1
7	3	3	0	1	3	0	1	1
8	0	2	1	1	1	1	1	1
9	1	0	2	1	2	1	1	1
10	3	0	2	1	0	1	2	1
11	2	0	3	1	2	1	2	1
12	2	1	3	1	2	2	2	1
13	1	0	1	2	3	1	0	2
14	0	3	1	2	0	2	1	2
15	1	3	1	2	2	2	1	2
16	3	1	2	2	3	2	1	2
17	0	2	2	2	0	3	1	3
18	2	2	2	2	1	3	1	1
19	1	1	0	3	2	3	0	2
20	1	2	1	3	2	0	1	2
21	3	0	3	3	2	3	1	2
22	0	3	3	3	3	3	1	2
23	3	3	3	3	3	3	2	2
24	1	2	1	2	3	0	1	3
25	2	1	2	3	0	2	1	3
26	2	3	3	1	2	3	1	3
27	1	3	0	2	3	3	1	3
28	1	1	2	1	2	2	1	2
29	2	2	1	3	2	2	2	2
30	1	3	1	0	2	1	3	3
31	0	1	1	1				
32	3	3	3	1				
33	2	1	1	2				
34	2	1	2	0				
35	2	0	1	3				
36	1	0	2	3				
37	0	3	3	2				
38	3	1	1	0				
39	3	1	2	0				
40	3	3	2	0				
41	2	0	2	1				
42	1	3	2	1				
43	2	2	0	3				
44	2	1	3	3				
45	1	2	3	3				
46	3	2	1	0				
47	3	2	3	0				
48	2	0	1	1				



---

---

**Calibració**

<b>Mostra</b>	<b>SFT</b>	<b>SDZ</b>	<b>SMRZ</b>	<b>SMTZ</b>
49	0	3	1	1
50	0	2	3	1
51	1	3	3	1
52	1	2	0	2
53	1	1	1	2
54	1	2	2	2
55	2	1	0	3
56	3	3	0	3
57	1	3	1	3
58	3	1	3	3
59	2	3	2	3
60	3	1	3	2
61	3	1	1	3
62	2	2	2	3
63	2	2	1	0
64	2	2	1	1
65	0	1	2	3
66	2	3	1	1
67	0	2	3	3
68	2	1	1	0
69	2	1	3	0
70	2	2	0	1
71	3	1	1	1
72	0	3	2	1
73	3	0	1	2
74	1	1	2	2
75	0	3	2	2
76	2	3	0	3
77	2	2	3	1
78	2	2	3	3
79	3	2	0	2
80	3	0	2	2
81	2	1	1	3
82	3	3	1	0
83	1	3	2	3
84	1	0	3	2
85	3	3	1	1
86	3	1	3	0
87	3	2	1	1
88	3	0	3	2
89	3	3	2	3
90	2	3	2	0
91	1	0	2	2
92	3	0	3	1
93	3	2	0	3
94	3	1	0	1
95	1	2	3	0
96	3	1	1	2
97	0	1	3	3

---

---

#### V.3.4. REGISTRE I PROCESSAMENT DE LES DADES

El registre dels espectres es realitza mitjançant un espectrofotòmetre de UV-Visible de díodes en línia Hewlett-Packard model HP-8453 A, que porta incorporat un bany termostàtic i un sistema d'agitació intern.

Del registre espectro-cinètic, s'obté per a cada mostra un vector que conté l'evolució espectral de les diferents espècies presents, el qual està constituït per un total de 7686 valors d'absorbància (61 espectres  $\times$  126 valors de longitud d'ona). Aquest vector conté els diferents espectres registrats, ordenats seqüencialment per temps creixent de reacció.

Els diferents models de calibració es construeixen utilitzant els algorismes PCR i PLS1 incorporats en el programa Unscrambler versió 7.5, l'algoritme nPLS desenvolupat per Bro [Bro, 1996] el qual funciona des del Matlab, i finalment les xarxes neuronals artificials (ANNs) incorporades en el programa Neural-Connection.v. 2.0. En tots els models, la matriu de dades es centra prèviament al seu processament.

S'assagen diferents models per tal d'optimitzar el mode espectral (absorbància i primera derivada), el rang de longituds d'ona de treball, i el temps de registre cinètic.

Per a la construcció dels models PLS1 s'utilitza el mètode de validació creuada amb 12 segments de cancelació seleccionades aleatòriament. El número de factors PLS que s'escull en aquests models, és el menor número de factors que presenta un  $MSECV_j$  no significativament diferent del mínim  $MSECV$ , seguint el criteri de significació proposat per Haaland and Thomas que utilitza un *F-test* amb una probabilitat  $P = 0,25$ .

En la construcció dels models nPLS1, el programa disponible no permet la utilització del mètode de validació creuada, i s'utilitza el mètode de test-set. El número de factors PLS que s'escull és aquell a partir del qual en afegir un nou factor al model, la variància explicada no millora significativament [Vandeginste, 1998].

El tipus de xarxa que s'utilitza en la construcció dels models ANNs és la *Multi-Layer Perceptron* (MPL) amb una sola capa oculta (i, h, o), i el procediment d'aprenentatge de la xarxa es basa amb l'algoritme de gradient conjugat, on els paràmetres d'aprenentatge són modificats pel mateix programa de càlcul emprat. S'assagen paràmetres estructurals de la xarxa com el número de neurones en la capa d'entrada i la capa oculta, així com la funció de transferència (lineal,

sigmoide o tangencial) utilitzada per cada neurona, i finalment el rang inicial i la distribució dels pesos (gaussiana o uniforme) per les connexions entre neurones de diferents capes. La capa de sortida està constituïda per una única neurona. Com a dades d'entrada s'utilitzen els scores d'un model PCA i d'un model PLS1, respectivament.

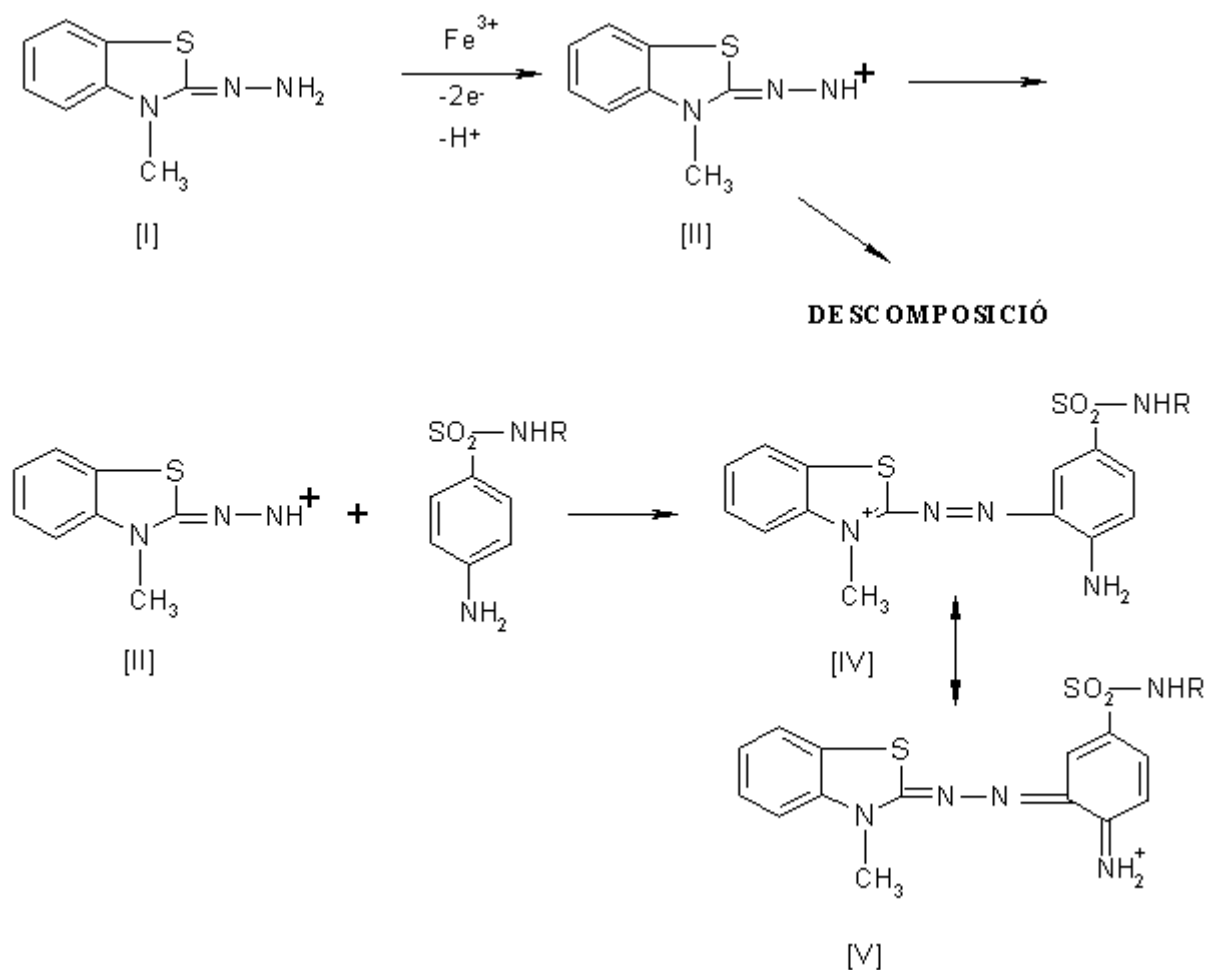
La selecció dels valors dels paràmetres òptims per a la construcció dels xarxes no és fàcil ni ràpid, ja que hi ha molts paràmetres a estudiar. El criteri que s'adopta és el d'escollir les arquitectures ANNs més simples les quals presentin el menor error de predicció de les mostres de test set, i que alhora no hi hagi un sobreajust acusat.

De la mateixa manera que es fa en els capítols anteriors, per tal de facilitar la comparació i interpretació dels resultats obtinguts en cada un dels diferents de models provats, es calcula l'error estàndard relatiu de predicció (RSEP%) pels diferents conjunts de mostres. En aquests conjunts està inclòs el conjunt de mostres de predicció extern, el qual no s'empra en cap etapa de la construcció dels models. La reproduïbilitat és calcula com a desviació estàndard relativa (RSD%) a partir de les prediccions del conjunt d'onze mostres d'idèntica composició. En aquest cas, també com a conseqüència del gran volum de variables a estudiar, es considera oportú que els resultats obtinguts pels diferents models ANN, siguin comparats entre ells mitjançant l'error quadràtic mig de predicció RMSEP (*Root Mean Squared Error of Prediction*).

## V.4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

### V.4.1. REACCIÓ DE LES SULFONAMIDES AMB MBTH EN PRESENCIA DE FE(III)

La reacció que s'utilitza és la azo-copulació oxidativa amb 3-metil-2-benzotiazolona hidrazona (MBTH) en presència de Fe(III) en medi àcid [Sawicki, 1961; López Carreto, 1997; Aguilar-Caballos, 1997]. La reacció té lloc en dos etapes ben diferenciades, i en el cas de les sulfonamides, el mecanisme proposat s'il·lustra a l'esquema 5.2, el qual es troba fortament afectat per les condicions experimentals.

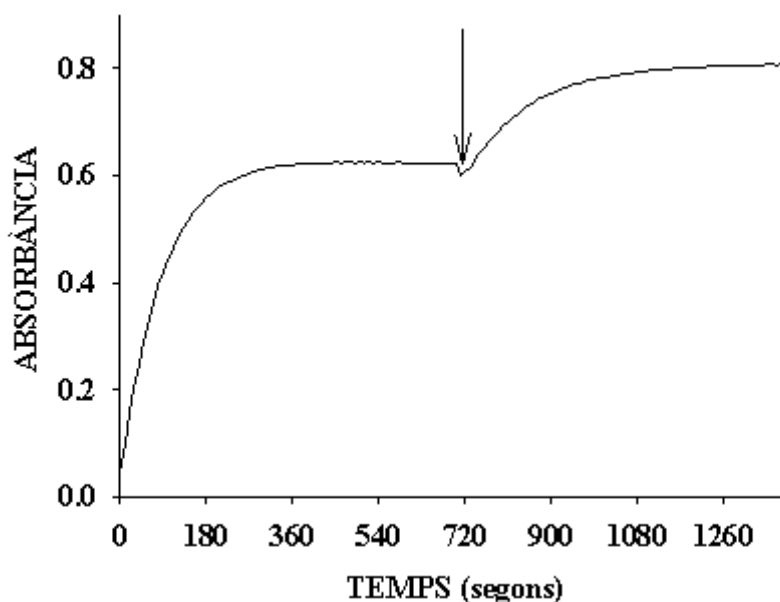


Esquema 5.2

En una primera etapa, el MBTH (I) s'oxida perdent dos electrons i un protó, formant així l'intermedi electrofílic (II) que és l'espècie activa en el procés de copulació. La segona etapa és

la substitució electrofílica a través de l'atac d'aquesta espècie a les posicions orto de les diferents sulfonamides, donant lloc als diferents cations azo-colorejats (IV-V) [El-Kommos, 1988].

A part de la reacció de azo-copulació, al llarg del desenvolupament experimental es troba que el intermedi electrofílic es descompon lliberant un gas amb abundant formació de bombolles (probablement  $N_2$ ), essent aquesta reacció bastant ràpida i responsable del consum de la major part de reactiu present en la cubeta, cosa que provoca que no s'assoleixin les condicions de pseudoprimer ordre que podrien esperar-se al posar el reactiu en excés al medi.



**Figura 5.1.** Perfil cinètic ( $\lambda = 570 \text{ nm}$ ), del derivat del SFT. La fletxa indica l'addició del medi de MBTH.

Per il·lustrar aquest efecte, a la figura 5.1 es mostra el perfil de la reacció del sulfatiazol a una concentració inicial de 10 cops inferior a la del MBTH ( $2 \times 10^{-3} \text{ M}$ ), en presència d'excés de Fe(III) ( $6 \times 10^{-3} \text{ M}$ ), per una concentració de HCl 0,1 M i una temperatura de  $60^\circ \text{C}$ . Es pot veure que un cop la reacció ha arribat a la seva fi, l'addició altra vegada de MBTH ( $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ ) l'engega de nou, fent evident la presència encara de sulfatiazol al medi malgrat el seu defecte inicial. Si pel contrari s'afegeix sulfatiazol, la absorbància es manté inalterable.

Per altra banda, l'acidesa té un doble efecte. Per un cantó afecta a la velocitat global de la reacció, com es ben conegut de qualsevol procés de azo-copulació, i per un altre, degut a l'equilibri àcid-base dels productes de reacció, té un efecte important sobre els espectres dels productes formats, ja que apareixen noves bandes a longituds d'ona més altes a mesura que augmenta l'acidesa del medi.

Malgrat tot, la forta dependència amb l'acidesa del medi constitueix un punt estratègic en la recerca de les condicions per fer màxima la discriminació entre les contribucions de les diferents sulfonamides al senyal mesurat. Però existeixen altres paràmetres experimentals que influeixen notablement en el procés estudiat, com són la temperatura i les concentracions de MBTH i de Fe(III).

#### V.4.2. ESTUDI DE LES CONDICIONS EXPERIMENTALS

Per tal d'assolir la màxima exactitud possible en la quantificació de les sulfonamides, en una primera etapa del treball, es porta a terme un estudi a fi de seleccionar els paràmetres experimentals més favorables per dur a terme la reacció entre les anteriors i el MBTH. Concretament, l'objectiu que es buscava era el de trobar les condicions que permetessin assolir una màxima discriminació cinètica i espectral.

La temperatura és el primer paràmetre estudiat, ja que es veu que afecta moltíssim a la velocitat de reacció. En el rang assajat de 25°C a 50°C, la velocitat de reacció per cada sulfonamida augmenta molt amb la temperatura, però també s'accelera la desaparició del reactiu en el medi, provocant una disminució considerable de l'extensió en que té lloc la reacció d'interès. A la figura 5.2 es mostren els perfils cinètics a 570 nm del derivat del sulfatiazol  $5 \times 10^{-4}$  M per reacció amb MBTH  $1 \times 10^{-3}$  M (Fe(III)  $2 \times 10^{-3}$  M) registrats a diferents temperatures de treball, on es pot apreciar l'efecte dels dos fenòmens.

S'escull una temperatura de 25°C per a dur a terme l'anàlisi, ja que d'aquesta manera a pesar que la reacció no sigui massa ràpida, es minimitza la desaparició del reactiu del medi, aspecte que d'entrada es pensa que és més important per la resolució del sistema plantejat. Amb tot i això, un percentatge elevat de la quantitat de MBTH introduïda al sistema no es converteix en espècie activa pel procés de copulació.